

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 439**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/505** (2006.01)

**A61K 38/18** (2006.01)

**C12N 15/85** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2006 E 06820043 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2012 EP 1947115**

54 Título: **Combinación de glicoisofomas para el tratamiento o la prevención de la septicemia, línea celular transgénica que produce glicoisofomas de eritropoyetina, composición farmacéutica que comprende dicha combinación, procedimiento para obtener la línea celular, procedimiento para producir la combinación de glicoisofomas y procedimientos para el tratamiento y la prevención de la septicemia**

30 Prioridad:

**10.11.2005 AR P050104712**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**21.02.2013**

73 Titular/es:

**PROTECH PHARMA, S.A. (100.0%)  
LISANDRO DE LA TORE, 3124 DPTO. 2-  
SANTA FE 3000, AR**

72 Inventor/es:

**LÓPEZ, RICARDO AGUSTÍN;  
DAELLI, MARCELO GUSTAVO;  
PEREIRA BACCI, DARDO ALEXIS;  
AMADEO, GABRIEL IGNACIO;  
PEREIRO, MIRIAM PATRICIA;  
ARTANA, CRISTINA NOEMI;  
MASKIN, NÉSTOR;  
PISTILLO, BERNARDO CÉSAR;  
ETCHEVERRIGARAY, MARINA;  
KRATJE, RICARDO y  
DIDIER, CAROLINA**

74 Agente/Representante:

**PAZ ESPUCHE, Alberto**

**ES 2 396 439 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

**“Combinación de glicoisofomas para el tratamiento o la prevención de la septicemia, línea celular transgénica que produce glicoisofomas de eritropoyetina, composición farmacéutica que comprende dicha combinación, procedimiento para obtener la línea celular, procedimiento para producir la combinación de glicoisofomas y procedimientos para el tratamiento y la prevención de la septicemia”**

La presente invención se refiere a una línea celular transgénica que produce una combinación de glicoisofomas de eritropoyetina, en la que tales glicoisofomas pueden comprender una cantidad de ácido siálico que oscila de 4 a 10 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, la combinación de glicoisofomas para el tratamiento o la prevención de la septicemia, una composición farmacéutica que comprende tal combinación, procedimientos para obtener la línea celular, un procedimiento para producir tal combinación de glicoisofomas, y procedimientos para el tratamiento y la prevención de la septicemia.

**Técnica anterior**

Las modificaciones producidas por las células eucarióticas en el patrón de glicosilación de las glucoproteínas pueden afectar a algunas de sus propiedades biológicas, tal como su transporte, secreción, estabilidad e interacción con otras moléculas y con los receptores (Witter, A. y Howard, S., *Biochem.* 29: 4175-4180, 1990; Hart, *Curr. Op. Cell Biol.* 4: 1017-1023, 1992; Gooche et al., *Bio/Technology* 9: 1347-1355, 1991; Parekh et al., *Curr. Op. Cell Biol.* 1: 750-754, 1991; Bevilacqua, M. y Nelson, R., *J. Clin. Invest.* 91: 379-387, 1993; Nelson et al., *J. Clin. Invest.* 91: 1157-1166, 1993; Norgard, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1068-1072, 1993; Imai et al., *Nature* 361: 555-557, 1993).

En sus formas naturales y recombinantes (producidas en líneas celulares eucarióticas transgénicas), la eritropoyetina humana (EPO) —una proteína usada de forma generalizada para la estimulación de la eritropoyesis— contiene cuatro cadenas oligosacáridas complejas unidas a la cadena polipeptídica. Tres de tales uniones son del tipo N y una es del tipo O. Su ubicación específica es bien conocida (Elliott, S. et al., *The Journal of Biological Chemistry* 279(16): 16854-16862, 2004; Watson et al., *Glycobiology* 4(2): 227-237, 1994). Los oligosacáridos con uniones de tipo N puede contener un número variables de residuos terminales de ácido siálico, hecho que afecta notablemente la actividad de la EPO (Egrie, J. y Browne, J., *Br. J. Cancer* 84(1): 3-10, 2001; Goldwasser et al., *J. Biol. Chem.* 249: 4202-4206, 1974). Por ejemplo, una cantidad mayor de ácido siálico alarga la vida media de la EPO en la sangre, pero reduce la afinidad debido al receptor relacionado con su actividad hematopoyética. En cambio, una EPO con contenido de ácido siálico menor o inexistente tiene baja vida media *in vivo* y un nivel de afinidad elevado debido a su receptor relacionado con su actividad hematopoyética (Fukuda et al., *Blood* 73: 84-89, 1989; Spivak, J. y Hogans, B., *Blood* 73: 90-99, 1989; Imai et al., *Eur. J. Biochem.* 194: 457-462, 1990; Higuchi et al., *J. Biol. Chem.* 267(11): 7703-7709, 1991). Para actuar como estimulante de la eritropoyesis *in vivo*, la EPO debe estar presente continuamente en la sangre en concentraciones adecuadas y, por lo tanto, un tiempo de vida *in vivo* prolongado aumenta notablemente su acción eritropoyética. En cambio, cuando está presente *in vivo* en concentraciones elevadas periodos cortos, tiene un efecto protector en los tejidos (Morishita, E. et al.; *Neuroscience* 76: 105-116, 1997), hecho que sugiere que la EPO con niveles bajos o inexistentes de ácido siálico es útil para la inducción de la protección tisular sin ningún efecto eritropoyético consiguiente. Esto sería muy significativo, dado que el aumento de glóbulos rojos en la sangre puede ser muy arriesgado. Por otra parte, si la EPO no contiene ácido siálico (asialo-EPO), su vida media *in vivo* es excesivamente corta y, por lo tanto, no es útiles ni para la estimulación de la eritropoyesis ni para la protección tisular.

Se sabe que la EPO recombinante producida en líneas celulares eucarióticas es una combinación de especies moleculares que comparten la misma cadena polipeptídica pero tienen cantidades diferentes de ácido siálico terminal presente en las cadenas oligosacáridas. Estas diversas formas de EPO se denominan glicoisofomas de EPO. Dado que estas glicoisofomas de EPO tienen cargas diferentes, cada una puede ser aislada del resto mediante, por ejemplo, la técnica de isoelectroenfoco. La mezcla de glicoisofomas de EPO producida por las células recombinantes puede variar según la línea celular en uso. Por ejemplo, cuando se produce la EPO en células CHO, las glicoisofomas contienen de 1 a 14 moléculas de ácido siálico.

Más allá del uso práctico de la EPO en la estimulación de la eritropoyesis, y principalmente debido a su efecto protector en los tejidos, se ha propuesto la EPO como principio activo en el tratamiento de diversas anomalías y enfermedades. Por ejemplo, la solicitud de patente de Baker et al., US nº 2004/0198663, divulga un procedimiento para reducir los efectos de la isquemia miocárdica y su daño asociado mediante la administración de cantidades efectivas de eritropoyetina. El documento de patente de Weiss, S. et al., US nº 6165783, divulga un procedimiento para inducir la diferenciación de células madre neurales o tratar enfermedades neurodegenerativas mediante la aplicación de cantidades efectivas de eritropoyetina. La solicitud de patente de Zaharia, V., US nº 2002/0169129, divulga un procedimiento que comprende la administración de una dosis efectiva de EPO recombinante humana para mejorar la calidad de vida de un paciente. La solicitud de patente de Campana W. M. et al., US nº 2004/0018978, divulga un procedimiento para el tratamiento naturopático del dolor y para la protección del sistema

nervioso periférico que comprende la administración de eritropoyetina. La patente estadounidense nº 6268336 divulga un procedimiento para tratar enfermedades hepáticas que comprende la administración de eritropoyetina. El documento de patente WO 03/057242 de Van Gilst, W. H. et al., divulga el uso de eritropoyetina para el tratamiento o la prevención de insuficiencias cardíacas. La patente estadounidense nº 6784154, de Westenfelder, Ch., divulga un procedimiento para la protección renal y para el tratamiento de la insuficiencia renal isquémica aguda que comprende la administración de eritropoyetina. El documento de patente WO 04/012759 de Haller H. et al., divulga el uso de la eritropoyetina para la estimulación, la movilización, la proliferación y la diferenciación de células madre endoteliales.

Durante muchos años, los investigadores se centraron en obtener eritropoyetinas con niveles elevados de ácido siálico para garantizar una vida media elevada en plasma, aumentando, por ejemplo, los sitios de glicosilación o enriqueciendo las glicoisformas de eritropoyetina con niveles elevados de ácido siálico (véase la patente estadounidense nº 5856298, de Strickland, T. W.). En la patente estadounidense nº 6673575, de Franze R. et al., se describe otro procedimiento para aumentar la glicosilación; y en el documento de patente WO 03/080852 se divulga un procedimiento cromatográfico para producir eritropoyetina de alta pureza con un perfil deseado de glicoisforma.

Por otra parte, el documento de patente estadounidense nº 6531121, de Bines, M. et al., divulga la administración de asialo-eritropoyetina para la protección y el mantenimiento de la viabilidad celular, tisular o de órganos, demostrando que la actividad de la asialo-eritropoyetina (asialo-EPO) es diferente de la de las descritas previamente.

La sepsis o septicemia es la respuesta sistémica a la infección. En ocasiones, esta respuesta puede agravarse y afectar las funciones de órganos tales como los riñones, el hígado, el corazón, los pulmones, los intestinos, el páncreas, el SNC, las glándulas suprarrenales y la médula ósea. También puede alterar el metabolismo, la coagulación, el sistema inmunológico, la perfusión regional de los órganos y la circulación sistémica, causando un choque séptico. La mortalidad séptica aumenta con una tasa directamente proporcional a la presencia y la gravedad del choque, y al número de las insuficiencias de órganos, oscilando entre el 30% si no hay implicada ninguna insuficiencia y el 100%, en el caso de que ocurran insuficiencias en cuatro o más órganos (Fry, D. E., Pearlstein, L., Fulton, R. L. et al., Multiple System Organ Failure. The Role of Uncontrolled Infection, Arch. Surg. 115: 136-140, 1980). A pesar de los desarrollos logrados hasta la fecha, la septicemia sigue siendo la principal causa de mortalidad en las unidades de vigilancia intensiva no coronaria (Angus, D.C. et al., Crit. Care Med. 29: 1303-10, 2001). Las bases terapéuticas actuales son: aumento del volumen de plasma usando cristaloides y/o coloides; soporte a los órganos con insuficiencias, incluyendo los que están en estado de choque; control estricto de la glucemia; uso de antibióticos y fármacos adecuados que modulen la respuesta inflamatoria y procoagulante (Dellinger, P. et al., Crit. Care Med. 32: 858-73, 2004; Bernard, G., Vincent, J. L., Laterre, P. F. et al., Efficacy and Safety of Recombinant Human Activated Protein C for Severe Sepsis, N. Eng. J. Med. 344: 699-609, 2001; Bernard, G. R., Margolis, B. D., Shanies, H. M. et al., Extended Evaluation of Recombinant Human Activated Protein C United States Trial (ENHANCE US)\* Chest. 125: 2206-2216, 2004). Sin embargo, la mortalidad sigue siendo alta, y prosigue la investigación con el objetivo de obtener mejores resultados terapéuticos. En este sentido, se han producido estudios notables en lo que se refiere a la posibilidad de activar las señales defensivas de respuesta al estrés en células de tejidos diferentes de pacientes sépticos.

Diversos estudios han postulado que la pérdida de linfocitos por apoptosis puede ser responsable de la elevada inmunosupresión observada frecuentemente en los pacientes sépticos (Wang, S. D. et al., J. Immunol. 152: 5014-21, 1994). Otros tipos de células, como los hepatocitos (Rogers, H. W. et al., J. Immunol. 156: 679-84, 1996), las células epiteliales prismáticas del tracto intestinal (Hotchkis, R. S. et al., Crit. Care Med. 25: 1298-1307, 1997) y las células del endotelio vascular (Haimovitz-Friedman, A. et al., J. Exp. Med. 186: 1832-41, 1997) también pueden morir por apoptosis durante el proceso de septicemia. Un estudio reciente realizado en pacientes cuya causa de muerte había sido la septicemia/un choque séptico demostró que la apoptosis ocurre sistemáticamente en muchos tipos de células, entre las cuales las células linfoides y las células epiteliales prismáticas del tracto intestinal son particularmente vulnerables (Hotchkis, R.S. et al., Crit. Care Med. 27: 1230-517, 1999). Para los fines de esta patente, el término "sepsis" también significará "septicemia".

Existe la necesidad de encontrar principios activos y formulaciones que reduzcan la mortalidad causada por la septicemia. Sorprendentemente, los inventores han descubierto que ciertas combinaciones de glicoisformas de eritropoyetina previenen de forma efectiva la septicemia, y también pueden ser usadas con éxito en el tratamiento de pacientes sépticos.

### **Resumen de la invención**

Uno de los objetivos de la presente invención es proporcionar una combinación de glicoisformas de eritropoyetina adecuada para el tratamiento y la prevención de la septicemia, en la que tales glicoisformas contienen ácido siálico en cantidades de 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, comprendiendo dicha combinación una cantidad entre 2 y 12% de la glicoisforma 4, que contiene 4 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 5 y 25% de la glicoisforma 5, que contiene 5 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 9 y 34% de la glicoisforma 6, que contiene 6 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 9 y 34% de la glicoisforma 7, que contiene 7 moléculas de ácido siálico por

molécula de eritropoyetina, entre 10 y 35% de la glicoisofoma 8, que contiene 8 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 2 y 23% de la glicoisofoma 9, que contiene 9 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina y entre 0 y 2% de la glicoisofoma 10, que contiene 10 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina. La eritropoyetina es eritropoyetina humana y puede ser natural, recombinante, análogos, mutantes, miméticos o fragmentos de eritropoyetinas. Tal combinación de eritropoyetina tiene actividad terapéutica y preventiva en la septicemia.

Otro objetivo de la presente patente es proporcionar una línea celular productora de eritropoyetina transgénica que produzca y libere al medio cualquier combinación de glicoisofomas de eritropoyetina, en la que tal combinación comprende una cantidad entre 2 y 12% de la glicoisofoma 4, que contiene 4 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 5 y 25% de la glicoisofoma 5, que contiene 5 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 9 y 34% de la glicoisofoma 6, que contiene 6 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 9 y 34% de la glicoisofoma 7, que contiene 7 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 10 y 35% de la glicoisofoma 8, que contiene 8 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 2 y 23% de la glicoisofoma 9, que contiene 9 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina y entre 0 y 2% de la glicoisofoma 10, que contiene 10 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina. La eritropoyetina es eritropoyetina humana y puede ser natural, recombinante, análogos, miméticos, mutantes o fragmentos de eritropoyetinas. La línea celular es la línea celular AB2H52, depositada en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) con el número de acceso DSM ACC2727. La combinación de eritropoyetina producida y purificada tiene actividad terapéutica como agente adecuado para el tratamiento y la prevención de la septicemia.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica adecuada para el tratamiento y la prevención de la septicemia, comprendiendo tal composición un principio activo constituido por una combinación de glicoisofomas de eritropoyetina, comprendiendo tales glicoisofomas ácido siálico en cantidades de 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, comprendiendo dicha combinación una cantidad entre 2 y 12% de la glicoisofoma 4, que contiene 4 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 5 y 25% de la glicoisofoma 5, que contiene 5 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 9 y 34% de la glicoisofoma 6, que contiene 6 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 9 y 34% de la glicoisofoma 7, que contiene 7 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 10 y 35% de la glicoisofoma 8, que contiene 8 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 2 y 23% de la glicoisofoma 9, que contiene 9 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina y entre 0 y 2% de la glicoisofoma 10, que contiene 10 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina y excipiente, en cantidades adecuadas. La eritropoyetina es eritropoyetina humana y puede ser natural, recombinante, análogos, miméticos, mutantes o fragmentos de eritropoyetinas. Tal composición puede comprender cualquier excipiente conocido en la técnica de fabricación de medicinas.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para obtener una combinación de glicoisofomas de eritropoyetina según la reivindicación 1. El procedimiento comprende las siguientes etapas:

- a. El cultivo, en un medio de cultivo, de la línea celular AB2H52, depositada en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) con número de acceso DSM ACC2727, teniendo dicho medio de cultivo una osmolalidad que oscila entre 310 y 450 miliosmol/kg de disolvente y aditivos seleccionados del grupo constituido por N-acetilglucosamina, cloruro amónico, cloruro sódico y combinaciones de los mismos, y
- b. La purificación y el aislamiento de la combinación de la glicoisofoma de eritropoyetina, llevándose a cabo la etapa de purificación y aislamiento de la combinación de la glicoisofoma de eritropoyetina mediante al menos una etapa cromatográfica. La combinación de eritropoyetina comprende un perfil de puntos isoeléctricos entre 4,0 y 5,3.

Se describe el procedimiento para obtener una línea celular que produce una combinación de glicoisofomas de eritropoyetina según la reivindicación 1. La eritropoyetina es eritropoyetina humana y puede ser natural, miméticos, recombinante, análogos, mutantes o fragmentos de eritropoyetinas. El procedimiento comprende las siguientes etapas:

- a. cultivo, en un medio de cultivo, de una línea celular productora de eritropoyetina transgénica, comprendiendo el medio de cultivo aditivos tales como N-acetilglucosamina, cloruro amónico, cloruro sódico o una combinación de los mismos, y todos ellos en diferentes proporciones;
- b. clonación de la línea celular;
- c. determinación del clon que produce tal combinación; y
- d. purificación y aislamiento de tal combinación de glicoisofomas de eritropoyetina. La osmolalidad del medio de cultivo oscila entre 310 y 450 miliosmol/kg de disolvente.

Otro objetivo de la presente patente es proporcionar una composición farmacéutica que comprende una combinación de glicoisofomas de eritropoyetina según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de la septicemia. La eritropoyetina es eritropoyetina humana y puede ser natural, recombinante, análogos, miméticos,

mutantes o fragmentos de eritropoyetinas. La combinación de glicoisofomas de eritropoyetina recombinante humana de la presente invención se usa en una dosis que oscila entre 10 µg/kg y 1.000 µg/kg de la combinación para una persona adulta de 70 kg.

- 5 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que comprende una combinación de glicoisofomas de eritropoyetina según la reivindicación 1 para su uso en la prevención de la septicemia. La eritropoyetina es eritropoyetina humana y puede ser natural, recombinante, análogos, miméticos, mutantes o fragmentos de eritropoyetinas. La combinación de glicoisofomas de eritropoyetina recombinante humana de la presente invención se usa en una dosis que oscila entre 10 µg/kg y 1.000 µg/kg de la combinación para un mamífero de 70 kg.
- 10 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar el uso de una combinación de glicoisofomas de eritropoyetina según la reivindicación 1, para su uso en la prevención y el tratamiento de la septicemia.

### **Breve descripción de las figuras**

- Figura 1: Esta figura muestra el mapa de restricción plasmídica usado en la transfección de la línea celular CHO.K1.
- 15 Figura 2: La Figura 2A muestra una SDS-PAGE tincionada con azul de Coomasie. La Figura 2B muestra bandas de transferencia de Western resultantes del gel aplicado según se muestra en la Figura 2A. La Figura 2C es la representación gráfica de la distancia migrada por cada patrón de peso molecular (PM) como una función del logaritmo de PM. En A, B y C, la cadena 1 corresponde a 25 µg de la EPO comercial (Eprex, Cilag-Jansen); la cadena 2 corresponde a 25 µg de la eritropoyetina de la presente invención, la cadena 3 corresponde a patrones de PM (BioRad, EE. UU.), la cadena 4 corresponde a 5 µg de la EPO comercial (Eprex, Cilag-Jansen); la cadena 5 corresponde a 5 µg de la eritropoyetina de la presente invención.
- 20 Figura 3: Esta figura muestra las bandas de ensayo de isoelectroenfoque tincionadas con azul de Coomasie. La cadena 1 corresponde a asialo-EPO, la cadena 2 corresponde a la eritropoyetina de la presente invención, la cadena 3 corresponde a eritropoyetina comercial (Eprex, Cilag-Jansen) y la cadena 5 corresponde a patrones de pI (GE Healthcare, Suecia). La Figura 3B es una representación gráfica de pI en función de la distancia de migración de cada pI obtenido.
- 25 Figura 4: Esta figura muestra la curva de supervivencia de ratones con septicemia inducida experimentalmente. Una hora antes de la doble ligadura y punción del ciego (CLP), los animales recibieron dosis de 5 µg/kg, 15 µg/kg o 30 µg/kg ya fuera de la combinación de glicoisofomas de EPO de la invención o de placebo (control).
- 30 Figura 5: Esta figura muestra la curva de supervivencia de ratones con septicemia inducida experimentalmente. Una hora antes de la CLP, los animales recibieron dosis de 15 µg/kg, 30µg/kg o 50 µg/kg ya fuera de EPO comercial (Eprex, Cilag-Jansen) o placebo (control).
- 35 Figura 6: Esta figura muestra curvas de supervivencia de ratones con septicemia inducida experimentalmente. Una hora antes de la CLP, los animales recibieron dosis de 15 µg/kg, 30 µg/kg o 50 µg/kg ya fuera de asialo-EPO (Eprex, Cilag-Jansen) o placebo (control).
- 40 Figura 7: Esta figura muestra la frecuencia de lesiones histopatológicas generales en razones sépticos tratados de manera preventiva con 50 µg/kg de EPO comercial o con 50 µg de la combinación de EPO de la presente invención.
- Figura 8: Esta figura muestra curvas de supervivencia de ratones con septicemia inducida experimentalmente. Una hora después de la CLP, los animales recibieron dosis de 15 µg/kg, 30 µg/kg o 50 µg/kg ya fuera de la combinación de glicoisofomas de EPO de la presente invención o de placebo (control).

### **Descripción detallada de la invención**

- 45 Para los fines de esta solicitud de patente, la expresión "la eritropoyetina de la presente invención" se referirá siempre a un grupo o una combinación de glicoisofomas de eritropoyetina según la reivindicación 1.

Se define una glicoisofoma de eritropoyetina como una eritropoyetina que tiene un único punto isoeléctrico (pI). Las diversas glicoisofomas tienen la misma secuencia de aminoácidos, pero sus pI difieren.

- 50 Se proporcionan líneas celulares eucarióticas transgénicas, preferentemente líneas celulares transgénicas que expresen eritropoyetina, particularmente una combinación de glicoisofomas de eritropoyetina que comprende glicoisofomas que contienen 4 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina a isoformas que contienen 10 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina. Por ejemplo, glicoisofomas que contienen 4, 5, 6, 7, 8, 9 y/o 10 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina.

- 55 La línea celular eucariótica puede ser, entre otras, una línea celular de mamíferos, y lo más preferente es que sea la línea celular transgénica AB2H52, depositada en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) con el número de acceso DSM ACC2727, conforme al Tratado de Budapest de fecha 22 de junio de 2005.

En cuanto al esqueleto de los aminoácidos, la eritropoyetina producida por la línea celular de la invención incluye, sin limitación, muteínas de eritropoyetina tales como las que tienen aminoácidos alterados en el extremo carboxilo terminal (patente estadounidense nº 5457089), análogos; péptidos que se usen al receptor; pequeñas moléculas que mimetizan la eritropoyetina que en esta solicitud se denominan miméticos (patente estadounidense nº 2002/0016350); eritropoyetina natural; mutantes tales como, por ejemplo, los modificados para reducir su inmunogenicidad (patente estadounidense nº 2004/0063917) o los modificados para aumentar su actividad (patente estadounidense nº 2004/0091961, incluida en su totalidad en el presente documento por referencia); conjugados (patente estadounidense nº 2004/0266690, incluida en su totalidad en el presente documento por referencia). Los expertos en esta técnica conocen que, para los fines de la presente invención, podría producirse eritropoyetina con cualquier esqueleto de aminoácidos con la condición de que la línea celular produjese glicoisoformas que contuvieran de 4 a 10 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina según la reivindicación 1. Por ejemplo, el esqueleto de aminoácidos de la eritropoyetina puede ser la ID SEC nº 1.

Se obtuvo la línea celular de la presente invención transfectando células CHO.K1 con el plásmido mostrado en la Figura 1. Se clonaron las células seleccionadas del cultivo que produjeron eritropoyetina, y la combinación producida de glicoisoformas fue evaluada mediante isoelectroenfoque-transferencia de Western, seguido por un estudio de densitometría de bandas.

Para desplazar el perfil de glicoisoformas hacia el de las glicoisoformas con un contenido menor de ácido siálico, los clones seleccionados fueron cultivados en condiciones diferentes. La presencia de N-acetilglucosamina en el medio de cultivo aumentó los porcentajes relacionados con glicoisoformas menos ácidas. Por otra parte, la adición de cloruro amónico 2,5 mM también desplazó el perfil de las isoformas hacia las menos ácidas y, por último, la adición de cloruro sódico 50 mM en el medio de cultivo también produjo el desplazamiento deseado. Cualquier experto en esta técnica sabe que pueden usarse otros tipos de sales de cloruro sódico, con la condición de que la osmolalidad del medio de cultivo se mantenga entre 310 y 450 miliosmol/kg de disolvente.

En una realización preferente, puede obtenerse la línea celular de la presente invención seleccionando los clones que produzcan la combinación de glicoisoformas de eritropoyetina de la invención según la reivindicación 1. La línea celular seleccionada puede cultivarse en presencia de cloruro amónico, cloruro sódico, N-acetilglucosamina o combinaciones de ellos para inducir la producción y la liberación de la combinación de glicoisoformas de eritropoyetina de la invención que comprende una cantidad que oscila del 2% al 12% de la glicoisoforma 4, del 5% al 25% de la glicoisoforma 5, del 9% al 34% de la glicoisoforma 6, del 9% al 34% de la glicoisoforma 7, del 10% al 35% de la glicoisoforma 8, del 2% al 23% de la glicoisoforma 9, y del 0% al 2% de la glicoisoforma 10.

En un estudio comparativo, se calcularon los pesos moleculares aparentes de la eritropoyetina de la presente invención y de la eritropoyetina comercial (Eprex, Cilag-Jansen). Como puede observarse en la Figura 2, el PM del ESP comercial estándar es de 35.500 Da, y el PM de la eritropoyetina de la presente invención es de 33.300 Da. Esta reducción en el peso molecular podría deberse a menor contenido medio de ácidos siálicos en la eritropoyetina de la presente invención.

En otro estudio comparativo, se determinaron los puntos isoeléctricos (pI) de la eritropoyetina de la presente invención, de la asialo-eritropoyetina y de la eritropoyetina comercial (Eprex, Cilag-Jansen). Tal como se muestra en la Figura 3, la cadena de asialo-eritropoyetina (1) muestra bandas "a" y "b" correspondientes a pI de 6,7 y 6,6, respectivamente. La cadena 2, en la que se seleccionó la eritropoyetina de la presente invención, muestra las bandas de c a i correspondientes a pI de 4,0 a 5,3. La cadena 3, en la que se sembró la EPO comercial, muestra bandas de j a m, correspondientes a los pI de 3,5 a 4,3.

A partir de los estudios llevados a cabo, se concluyó que el contenido medio de ácido siálico medido según la farmacopea europea es como sigue:

Eritropoyetina de la invención: 7,6 moles de ácido siálico/mol de polipéptido.  
 Asialo-EPO: 4,4 moles de ácido siálico/mol de polipéptido.  
 EPO comercial (Eprex, Cilag-Jansen): 11,3 moles de ácido siálico/mol de polipéptido.

El pI, los porcentajes y el contenido de ácido siálico de cada glicoisoforma de la presente invención fueron determinados por medio de la técnica de isoelectroenfoque (Tabla 1). El contenido de ácido siálico de cada glicoisoforma se muestra en la tabla siguiente:

Tabla 1

Banda	pI	%	Moles de ácido siálico/mol de eritropoyetina de la invención
4	5,21 ± 0,07	6,2 ± 2,2	4
5	4,90 ± 0,08	14,5 ± 3,0	5
6	4,66 ± 0,11	21,4 ± 2,9	6
7	4,47 ± 0,08	21,9 ± 1,7	7
8	4,26 ± 0,06	22,3 ± 2,5	8
9	4,14 ± 0,04	13,2 ± 1,2	9

Banda	pI	%	Moles de ácido siálico/mol de eritropoyetina de la invención
10	4,04 ± 0,05	0,7 ± 0,2	10

Se llevaron a cabo estudios comparativos para evaluar las actividades biológicas de la eritropoyetina de la presente invención, de la eritropoyetina comercial (Eprex, Cilag-Jansen) y de la asialo-eritropoyetina. Tal como se muestra en la Tabla 2, la actividad eritropoyética *in vitro* de la eritropoyetina de la presente invención es intermedia en comparación con las de las de la asialo-EPO y la de la EPO comercial.

Tabla 2

Muestra	UI/mg
EPO comercial	120.000
Preparado de la invención	179.908
Asialo-EPO	623.743

Sin embargo, la actividad hematopoyética *in vivo* del preparado de la presente invención que se midió en ratones normocinéticos según la farmacopea europea es notablemente inferior a la de la EPO comercial (Tabla 3).

Tabla 3

Preparado	Actividad eritropoyética específica (UI/mg)
EPO de la invención	6.180
EPO comercial	120.000

5 Para comparar las vidas medias de la eritropoyetina de la presente invención, de la asialo-EPO y de la EPO comercial (Eprex, Cilag-Jansen) en el plasma, se llevaron a cabo ensayos *in vivo* sobre ratas Wistar. En la Tabla 4 se muestran los resultados de la depuración plasmática. Como cabía esperar, la depuración plasmática de la eritropoyetina de la presente invención es intermedia en comparación con la de la EPO comercial, que es más ácida, y la de la asialo-EPO.

10

Tabla 4

Preparado	Depuración plasmática (minutos)
Preparado de la invención	27,5
EPO comercial	134,0
Asialo-EPO	1,8

Después, se llevó a cabo un estudio sobre el efecto preventivo del preparación de la invención en la supervivencia de ratones sépticos, entre los que se indujo la infección por medio de la técnica de CLP (ligadura y punción del ciego). Se observó que la eritropoyetina de la presente invención reducía la mortalidad cuando se administraba en dosis de 15 µg/kg, 30 µg/kg y 50 µg/kg (Figura 4) ( $p=0,02$ ,  $0,03$  y  $0,01$ , respectivamente) (prueba de intervalos logarítmicos).

15

No murió ninguno de los animales del grupo de simulación (definición: grupo de simulación se refiere a animales en los que se llevó a cabo una cirugía simulada para evaluar el estrés quirúrgico).

A diferencia de la eritropoyetina comercial, la combinación de glicoisofomas de EPO de la presente invención se puede usar a dosis mayores sin causar un efecto trombopoyético.

20 La EPO comercial (Eprex, Cilag-Jansen) redujo la mortalidad cuando se administró a una dosis de 15 µg/kg (Figura 5). Sin embargo, a dosis mayores, la EPO comercial no fue tan efectiva y aumentaba la mortalidad, probablemente debido al daño causado por el aumento de eritropoyesis y el consiguiente efecto trombopoyético.

La asialo-EPO no redujo la mortalidad en ninguna de las dosis estudiadas (Figura 6).

25 La aplicación de eritropoyetina puede prevenir o ser útil en el tratamiento de la septicemia siempre que tal eritropoyetina no sea asialo-EPO.

Tal como se divulga en la presente patente, la combinación de glicoisofomas de eritropoyetina según la reivindicación 1 es útil para el tratamiento y la prevención de la septicemia, del choque séptico y de otros trastornos, tales como el choque hipovolémico grave y trastornos causados por agentes tóxicos, hipoxia, isquemia o necrosis, entre otros.

30 La combinación de glicoisofomas para el tratamiento y la prevención de la septicemia es la combinación que comprende glicoisofomas de 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, según la reivindicación 1. Más preferentemente, es la combinación de glicoisofomas que libera en el medio de cultivo la línea celular de la presente invención.

35 Por otra parte, se estudió el daño multiorgánico (MOD) en los animales tratados. La Figura 7 muestra que la combinación de isoformas de la invención redujo drásticamente la incidencia de lesiones histopatológicas graves asociadas con la septicemia (4,2% con contra un control del 28%  $p=0,001$ ), mientras que no se observó ese beneficio en el caso de la administración de EPO comercial (EPO comercial 25,5% contra un control del 28%  $p=NS$ ). La Tabla 5 muestra que la incidencia de un daño renal grave (congestión intensa, necrosis tubular aguda o necrosis renal focal) fue como sigue: Control: 28,5%, EPO comercial: 14,2%, combinación de la EPO de la invención: no se observó ningún daño renal. El 25% del grupo de control, el 37,5% del grupo de la EPO comercial y el 12,5% del grupo de los animales tratados con la combinación de la EPO de la invención presentaron compromiso hepático (congestión intensa o necrosis).

40



5 No se observó ningún daño renal en el grupo de animales tratado con la EPO de la invención, mientras que el 42,8% de los animales del grupo de control y el 37,5% de los animales tratados con EPO comercial presentaron necrosis intestinal o lisis apical. El 25% de los animales, tanto en el grupo de control como en el grupo de la EPO comercial, y el 12,5% de los animales tratados con la combinación de la EPO de la presente invención tuvieron un daño pulmonar relacionado con la septicemia (necrosis, congestión intraalveolar o hemorrágica).

Los animales tratados con la combinación de isoformas de la presente invención no tuvieron ningún daño cardiaco, mientras que el 37,5% del grupo de control y el 25% de los animales del grupo de la EPO comercial presentaron daño miocárdico. Ningún ratón tuvo daño cerebral, salvo un animal del grupo de control que presentó infiltrado inflamatorio.

10 Tabla 5: Lesiones histopatológicas en órganos de animales que sobrevivieron a una septicemia experimental

<b>Grupo de control</b>						
<b>Día</b>	<b>Hígado</b>	<b>Riñón</b>	<b>Intestino</b>	<b>Pulmones</b>	<b>Corazón</b>	<b>Cerebro</b>
1	Congestión intensa	Congestión intensa	Necrosis	Congestión	Congestión	Congestión
2	S/P	Congestión	Hiperplasia linfoide	Congestión hemorrágica	Congestión	S/P
3	Necrosis	Congestión	NO	Congestión hemorrágica	Congestión	S/P
4	Congestión	Congestión intensa	S/P	S/P	S/P	S/P
4	Congestión	NO	Necrosis Hiperplasia linfoide	Congestión	S/P	S/P
5	Congestión	S/P	Lisis apical	S/P	S/P	S/P
5	Edema	S/P	Hiperplasia linfoide	S/P	S/P	S/P
6	Hematopoyesis	S/P	S/P	S/P	S/P	S/P
<b>Grupo de animales tratados con EPO comercial</b>						
<b>Día</b>	<b>Hígado</b>	<b>Riñón</b>	<b>Intestino</b>	<b>Pulmones</b>	<b>Corazón</b>	<b>Cerebro</b>
1	Congestión intensa	Congestión intensa	Hiperplasia linfoide	Congestión intensa	Congestión	NO
2	Necrosis	NO	Necrosis difusa	Congestión intensa	Congestión	S/P
3	Necrosis	Congestión	Necrosis	Congestión	S/P	S/P
3	Congestión	Embolia séptica	Edema	Congestión	Embolia séptica	S/P
4	Congestión	S/P	S/P	S/P	S/P	NO
4	S/P	S/P	S/P	S/P	S/P	S/P
4	S/P	S/P	Hiperplasia linfoide	S/P	S/P	NO
5	Edema	S/P	Lisis apical	Congestión	S/P	NO
<b>Grupo de animales tratados con las isoformas de combinación de esta invención</b>						
<b>Día</b>	<b>Hígado</b>	<b>Riñón</b>	<b>Intestino</b>	<b>Pulmones</b>	<b>Corazón</b>	<b>Cerebro</b>
1	Congestión intensa	Congestión	S/P	Congestión intensa	S/P	S/P
2	S/P	S/P	S/P	S/P	S/P	S/P
3	S/P	S/P	S/P	S/P	S/P	S/P
3	Congestión	S/P	S/P	S/P	S/P	S/P
4	S/P	S/P	S/P	S/P	S/P	S/P
5	Congestión	Congestión	S/P	Congestión	S/P	S/P
6	Congestión	S/P	S/P	S/P	S/P	S/P
6	Congestión	Congestión	S/P	S/P	S/P	S/P

Estos resultados muestran claramente que la combinación de isoformas de EPO de la presente invención es útil para la prevención del daño multiorgánico y la muerte causados por la septicemia.

15 Para verificar si el preparado de la invención es también útil para prevenir la muerte causa por la septicemia una vez que se establece, se indujo septicemia experimental en ratones mediante la técnica de CLP. Se observó que la combinación de isoformas de la presente invención reducía significativamente la mortalidad cuando se administraba en una dosis de 50 µg/kg 1 hora después de la CLP (Fig. 8). Por lo tanto, el preparado de la invención también es útil para aumentar la supervivencia cuando el tratamiento se aplica posteriormente a la septicemia.

La invención también comprende una composición farmacéutica adecuada para el tratamiento de la septicemia o de otros trastornos relacionados. En una realización preferente, la composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de la septicemia comprende diversas combinaciones de glicoisoformas que contienen 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina según la reivindicación 1. Más preferentemente, es la combinación de glicoisoformas según la reivindicación 1, así como excipientes bien conocidos del estado de la técnica, liberadas en el medio de cultivo por la línea celular de la presente invención.

La composición farmacéutica de la presente invención puede ser fabricada, por ejemplo, en forma de píldoras, comprimidos, cápsulas, partículas; soluciones infralinguales, intranasales o inyectables u otras formas conocidas en esta técnica, la totalidad de las cuales se encuentra en el alcance de la presente invención.

Como ejemplo no limitante, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender 400,00 µg/kg de la eritropoyetina de la invención por 1 mL de solución inyectable; albúmina humana, 1,2 mg de fosfato monohidratado de sodio monobásico; 1,8 mg de fosfato anhidro de sodio dibásico; 0,7 mg de citrato de sodio; 5,8 mg de cloruro sódico; y 6,8 mg de ácido cítrico en agua USP para inyectables (pH 6,9 ± 0,3).

En lo que respecta al uso de la combinación de isoformas de EPO de la presente invención, tal combinación puede aplicarse con concentraciones mayores que las de la EPO comercial para el tratamiento o la prevención de la septicemia o de otros trastornos relacionados sin causar efectos tales como el aumento de eritropoyesis. Por otra parte, la aplicación de asialo-EPO apenas es útil para el tratamiento de la septicemia.

La presente invención se ilustra mejor en los siguientes ejemplos.

### Ejemplos

Ejemplo 1: Obtención de una línea celular productora de eritropoyetina

La línea celular usada fue la CHO.K1 (ATCC CCL-61). Para las etapas de desarrollo y mantenimiento, el medio de cultivo usado fue el denominado Medio 1 (compuesto de una mezcla 1:1 de los medios D-MEM (Gibco) y F12 de Ham (Gibco) complementada con bicarbonato sódico (Gibco) a 2,441 g/l, glucosa D (+) anhidra (Sigma) a 1,183 g/l, piruvato sódico (Gibco) a 0,11 g/l, glutamina (Sigma) a 1,10 g/l, triptófano (Sigma) a 0,027 g/l, ácido aspártico (Sigma) a 0,04 g/l, serina (Sigma) a 0,080 g/l, suero fetal bovino (SFB) (Bioser) al 8% V/V, y gentamicina (Gibco) a 50 µg/ml.

Las células fueron transfectadas con el plásmido denominado *pnrepo* (Figura 1), obtenido clonando el gen de la eritropoyetina humana del plásmido comercial *pCIneo* con expresión eucariótica.

Las células transfectadas fueron seleccionadas usando el antibiótico neomicina y las células productoras fueron analizadas usando el ensayo *InmunoDot*.

Las líneas celulares que mostraban un elevado nivel de producción de eritropoyetina fueron clonadas mediante el procedimiento de disolución limitante. Los clones más productores fueron seleccionados mediante el *InmunoDot*, y se analizó el patrón de isoformas de eritropoyetina producido por cada uno de tales clones seleccionados.

Ejemplo 2: Evaluación del patrón de glicosilación de las glicoisoformas producidas

El patrón de isoformas producido por cada clon fue estudiado por medio de isoelectroenfoque y transferencia de Western, seguido por densitometría de bandas. El enfoque isoelectroenfoque se llevó a cabo por medio de un dispositivo Multiphor II (GE Healthcare).

Se preparó el soporte electroforético usando una concentración de acrilamida/bisacrilamida del 8% (p/v) con la adición de 7 M de urea y anfólitos para generar un intervalo de 3-10 de pH.

El preenfoco de anfólitos se llevó a cabo durante 1 hora usando 2.000 V - 100 mA - 10 W a 10°C. Después, 20 µl (20 µg) de muestras de las glicoisoformas de EPO fueron parcialmente purificados de los sobrenadantes de los clones seleccionados. El enfoque se llevó a cabo durante 30 minutos en las mismas condiciones.

Después del enfoque isoelectroenfoque, el gel fue tincionado con una solución de azul de Coomassie o, alternativamente, las isoformas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa. La transferencia se llevó a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente.

Por último, se detectó la presencia de glicoisoformas de EPO en las membranas de nitrocelulosa por medio de una reacción inmunoquímica específica. Se seleccionaron los clones que mostraban un patrón de glicoisoformas con predominancia de glicoisoformas con menor contenido de ácido siálico, y se llevó a cabo un desplazamiento hacia glicoisoformas con menor contenido de ácido siálico.

50

## Ejemplo 3: Obtención de clones de células productoras de eritropoyetina con bajo contenido de ácido siálico

Para obtener clones productores de un perfil de isoformas de eritropoyetina humana desplazado hacia los que contienen una cantidad reducida de ácido siálico, los clones seleccionados en el Ejemplo 2 fueron cultivados en diferentes condiciones:

- 5 a) En un medio de SMIF 6 con la adición de 20 mM de N-acetilglucosamina (GlcNAc).
- b) En un medio de SMIF 6 con la adición de 2,5 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .
- c) En un medio de SMIF 6 con la adición de 50 mM de  $\text{NaCl}$ .

El patrón de glicosilación de las isoformas fue evaluado usando los procedimientos descritos en el Ejemplo 2 y se seleccionaron los clones que producían un patrón de isoformas con bajo contenido de ácido siálico.

## 10 Ejemplo 4: Enriquecimiento y purificación de isoformas de eritropoyetina humana con menor contenido de ácido siálico

En una etapa inicial, se filtró el sobrenadante de cultivo en cartuchos con poros de tamaño de 3 - 0,8  $\mu\text{m}$  y, secuencialmente, en cartuchos con poros de tamaño de 0,8 - 0,45  $\mu\text{m}$  (Pall Technology, EE. UU.), aplicando una presión inferior a 49,03 kPa. La cosecha filtrada fue procesada inmediatamente.

- 15 Después, se aplicó un volumen de 18 litros del medio filtrado a una columna BPG 100/500 (10 × 12,7 cm) que contenía 1 litro de Fast Flow de sefarosa azul (GE Healthcare) con equilibrio previo de 50 mM de fosfato con un pH 7 con un flujo variable de 11-27 ml/minuto. Esta metodología permitió la captura de todas las isoformas de EPO presentes en el sobrenadante del cultivo.

- 20 Después se lavó la columna con tampón de equilibrio usando una solución de 4-7 volúmenes de columna (CV). Se recuperaron todas las glicoisformas de EPO absorbidas usando una solución de 2,5-4 CV compuesta de  $\text{NaCl}$  675 mM, 20% de etanol (v/v), Tris 20 mM pH 6,5 a un flujo de 44-67 ml/minuto. La columna fue lavada de forma exhaustiva usando agua de calidad MilliQ y mantenida en una solución de etanol al 20% (v/v). El producto de la elución se concentró hasta un volumen que oscilaba entre 75 y 100 ml y se llevó a cabo un cambio de tampón con una solución de Tris 20 mM con pH 6,5, usando un sistema de ultrafiltrado tangencial Pellicon (Millipore, EE. UU.)
- 25 con cartuchos con poros de tamaño de 10 kDa y una superficie de 0,1  $\text{m}^2$ . El producto fue diafiltrado usando 10 veces el volumen concentrado. El producto resultante se mantuvo a  $-20^\circ\text{C}$  o fue procesado inmediatamente.

- 30 Se aplicaron de 2,1 a 6,2 litros del producto obtenido en la etapa anterior a una columna BPG 100/500 (10 × 14 cm) que contenía 1,1 litros de Big Bead de sefarosa Q (GE Healthcare) previamente equilibrada con una solución de Tris 20 mM con pH 6,5 con flujo de 25 ml/minuto. Se lavó con tampón de equilibrio de 1,5-2,5 CV. Las isoformas de EPO menos ácidas se recuperaron usando una solución de 50 mM de glicina de 3-4 CV.

Se llevó la solución de 50 mM de glicina hasta un pH de 5 añadiendo 1 M de pH 5 de tampón de acetato y una solución 10 N de  $\text{NaOH}$ . Se aplicó un volumen de 2 a 3 litros de muestreo a una columna XK 50/20 (2,5 × 5 cm) que contenía 50 ml de Fast Flow de sefarosa Q (GE Healthcare) previamente equilibrada 20 mM con pH 5 de tampón de acetato con flujo de 25 ml/minuto.

- 35 Se llevaron a cabo dos lavados: uno con 5 CV de 20 mM con pH 5 de tampón de acetato, y otro con 1 CV de 20 mM con pH 6,5 de tampón de citrato. Las glicoisformas de EPO menos ácidas se recuperaron con una solución de 100 mM de  $\text{NaCl}$  en 20 mM con pH 6,5 de citratos, recogiendo así 7 volúmenes de columna. El flujo de trabajo fue constante en todo el experimento.

## Ejemplo 5: Caracterización de la eritropoyetina de la invención

- 40 a) Determinación del peso molecular:

- 45 Se determinó el peso molecular aparente de las diferentes muestras de EPO purificadas según el Ejemplo 4 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) y un agente reductor de enlaces bisulfuro (betamercaptoetanol). La electroforesis se llevó a cabo, básicamente, siguiendo el procedimiento descrito por Laemmli (Laemmli, Reino Unido, 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685, incluido en esta patente como referencia) usando el sistema de electroforesis modular Mini Protean II (Bio-Rad, California, EE. UU.).

- 50 Con este fin, se resuspendieron muestras de EPO (25  $\mu\text{g}$ ) en una solución de 50 mM Tris-HCl, 2% SDS (p/v), 10% glicerol (v/v), 5%  $\beta$ -ME (v/v), 0,05% azul de bromofenol (p/v), pH 6,8. Las muestras se incubaron a  $100^\circ\text{C}$  durante 3 minutos y se aplicaron sobre un gel de carga de acrilamida/bisacrilamida con una concentración del 5% (p/v). Se polimerizó el gel de separación con una concentración de acrilamida/bisacrilamida del 12% (p/v). Simultáneamente, se sembraron marcadores de peso molecular (Bio-Rad) con el fin de determinar el peso molecular aparente de las muestras estudiadas. La tanga electroforética se llevó a cabo con una tensión constante (200 V) hasta que el frente de la tanga alcanzó 0,5 cm desde el borde inferior del gel de separación.

Por último, el gel fue manchado-tincionado con azul brillante de Coomasie mediante una inmersión de 10 minutos en una solución compuesta de Coomasie R-250 al 0,1% (p/v) en metanol al 40% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v). El gel se decoloró usando una solución compuesta de metanol al 7,5% (v/v) y ácido acético al 5% (v/v) hasta que se revelaron bandas claras contra un fondo completamente sin tinción.

- 5 Se determinó el peso molecular aparente por interpolación de la distancia migrada por cada muestra en una representación gráfica de la distancia migrada por cada marcador según su peso molecular.

b) Determinación del punto isoeléctrico

Se determinó el punto isoeléctrico aparente de cada muestra de EPO diferente usando una técnica de isoelectroenfoco en gel con el sistema Multiphor 11 (GE Healthcare, Suecia).

- 10 El soporte electroforético se preparó usando una mezcla de acrilamida/bisacrilamida con una concentración del 8% (p/v) con la adición de 7 M de urea y anfolitos para generar un gradiente de 3-10 de pH. El gel fue preenfocado a 2.000 V - 100 mA - 10 W durante 1 hora. Después, se sembraron 20 µg de los diversos preparados de EPO en un volumen del 20 µl, luego se procedió con el enfoque durante 40 minutos en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Se sembraron marcadores de puntos isoeléctricos (GE Healthcare) como controles.

- 15 Una vez que se completó el isoelectroenfoco, se coloreó el gel con azul brillante de Coomasie y luego fue sometido a decoloración hasta que se obtuvieron bandas claras contra un fondo completamente sin tinción. Se determinó el punto isoeléctrico aparente por interpolación de la distancia migrada por cada muestra en una representación gráfica de la distancia migrada por cada marcador en función de su punto isoeléctrico.

Ejemplo 6: Análisis *in vitro* de la actividad biológica de la eritropoyetina

- 20 La actividad biológica se llevó a cabo en un ensayo de proliferación usando células TF-1.

Medios de cultivo usados:

- 25 Medio de cultivo: 500 ml de medio RPMI 1640 (Gibco, EE. UU.), 5 ml de 200 mM de L-glutamina (Fluka, Alemania), 0.75 g de NaHCO<sub>3</sub> (Gibco, EE. UU.), 50 µg/ml de gentamicina (Parafarm, Argentina), esterilizado por filtración a través de filtros con poros de 0,22 µm; complementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% v/v (Bioser, Argentina), 5 ml de 5 mM β-mercaptoetanol (Merck, Alemania), y 5 ng/ml de rhGM-CSF (Growgen, Bioprofarma S.A., Argentina).

Medio de ensayo: Medio de cultivo de crecimiento carente de rhGM-CSF.

Medio de lavado: Medio de cultivo de crecimiento carente de rhGM-CSF y SFB.

- 30 Se usó una suspensión de células TF-1 en fase de crecimiento logarítmico. Se lavaron las células con 30 ml del medio de lavado 3 veces. Después, las células fueron resuspendidas en el medio de ensayo con una concentración de 200.000 células/ml, e incubadas a 37°C durante 2 horas. Por último, se sembraron 50 µl de las suspensiones de células en cada cavidad de una placa de 96 pocillos (salvo los pocillos correspondientes al control del reactivo cromático) y se añadió lo siguiente: 50 µl de la eritropoyetina de la invención purificada según el Ejemplo 4; 50 µl de una eritropoyetina comercial (Eprex, Cilag-Jansen) (7.500 mU/ml) en disoluciones en serie en el medio para tener curvas de variaciones de la concentración que oscilan entre 15 y 2.000 mU/ml; 50 µl de asialo-EPO; y 50 µl del medio de ensayo, según sea el caso. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 72 horas.

Los controles sometidos a ensayo se realizaron según el siguiente detalle:

- control positivo: 50 µl del medio de ensayo, complementado con 7.500 mU/ml de EPO.
- control negativo: 50 µl del medio de ensayo.
- control de reactivo cromático: solo se pusieron 100 µl del medio de ensayo.

- 40 Por último, se añadieron a cada cavidad 20 µl de la solución cromática (2 ml de una solución de 2,0 mg/ml de MTS (Promega, EE. UU.), y 100 µl de una solución de 0,92 mg/ml de PMS (Sigma, EE. UU.)). Se incubó a 37°C y 6 horas. Después, el color revelado se leyó en un lector ELISA con dos longitudes de onda: 492 y 690 nm.

Ejemplo 7: Evaluación de la depuración de la eritropoyetina

- 45 Se usaron 18 ratas hembra de la variedad Wistar de entre 8 y 10 semanas de edad y 200 g de peso del bioterio de la CNEA (Comisión Nacional de Energía Atómica de Argentina).

Los animales estaban alojados en el bioterio del laboratorio de cultivos celulares FBCB-UNL, con libre acceso a agua y a una dieta equilibrada. La temperatura del sector se mantuvo a 23°C. El régimen de iluminación fue de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad.

- 50 Los animales fueron divididos de forma aleatoria en 3 grupos de 6 individuos cada uno. Cada grupo fue dividido, a su vez, en 3 subgrupos de 2 animales cada uno. Los subgrupos fueron mantenidos en jaulas separadas.

Los preparados evaluados fueron: el preparado de la invención, EPO comercial (Eprex, Cilag-Jansen) y asialo-EPO.

5 El asialo-EPO se preparó mezclando EPO comercial (Eprex, Cilag-Jansen), una cantidad suficiente de un tampón proporcionado en el estuche de Neuroaminidasa-P0720S (New England BioLabs Inc., EE. UU.) y una cantidad suficiente de la enzima neuraminidasa proporcionada en dicho estuche. Se mezcló y se incubó a 37°C durante 2 horas. Por último, la mezcla fue dializada contra PBS a 4°C durante la noche.

10 Los animales fueron anestesiados mediante inyección intramuscular de una mezcla compuesta de 140 µl de 50 mg/ml de ketamina y 75 µl de 20 mg/ml de xilacina. Una vez anestesiados, los animales fueron inoculados con una inyección en la vena principal del rabo. Se inyectaron en cada animal 500 µg de la correspondiente eritropoyetina según el esquema de tratamiento, en un volumen de 500 µg de solución, usando jeringas de tuberculina dotadas de agujas de 29 g.

Los animales fueron sangrados mediante la punción de la vena retroorbital usando una pipeta de Pasteur heparinizada. Se recogió la sangre en tubos Falcon que contenían 50 µg de 5.000 UI/ml de heparina sódica. Las muestras fueron centrifugadas a 700 g y a 20°C en un centrifugador Eppendorf 5403 (Alemania) durante 20 minutos, y el plasma obtenido mediante este procedimiento se mantuvo a -20°C.

15 Se tomaron muestras de sangre de los animales de cada grupo en los minutos 0, 2, 6, 15, 30 y 60 minutos posteriores a la inyección, y en las horas 2, 3, 5, 24 y 30 posteriores a la inyección.

Las concentraciones de plasma de las diferentes eritropoyetinas inyectadas se determinaron mediante ELISA de fase doble (Amadeo, I., et al., J. Immunol. Meth. 293: 191-205, 2004, incluido en su totalidad en el presente documento como referencia).

20 Se construyeron curvas de concentración en función del tiempo posterior a la inyección, dando como resultado los siguientes parámetros farmacocinéticos:

Máxima concentración en plasma ( $C_{m\acute{a}x}$ ) y tiempo máximo ( $T_{m\acute{a}x}$ ), correspondiente al tiempo en el que se alcanza la máxima concentración ( $C_{m\acute{a}x}$ ).

25 Se determinaron otros parámetros farmacocinéticos ajustando los datos experimentales mediante una ecuación biexponencial para la concentración (C) en plasma en función del tiempo (t), según se muestra en la Ecuación (1) :

$$C = A \cdot e^{-\alpha t} + B \cdot e^{-\beta t} \quad (1)$$

30 en la que A y  $\alpha$  son constantes de la fase inicial que refleja la distribución de eritropoyetina en los fluidos intercelulares de todos el animal, mientras que B y  $\beta$  son constantes de la fase de eliminación que están relacionadas con la depuración plasmática real (Donahue et al., Cold Spring Harbor Symp Qant. Biol. 51: 685-692, 1986, incluida en su totalidad en el presente documento como referencia). Se estimaron estas constantes a partir de los datos empíricos mediante el uso de instrumentos de ordenador (Microcal™ Origin™, versión 5.0, Microcal Software, EE. UU.). El tiempo de la vida media de distribución ( $T_{1/2\beta}$ ), el tiempo de la vida media de eliminación ( $T_{1/2\alpha}$ ), y la depuración plasmática total (CL) se calcularon usando las Ecuaciones (2), (3) y (4), respectivamente:

$$\left(T_{1/2\alpha}\right) = 0,693/\alpha \quad (2)$$

$$\left(T_{1/2\beta}\right) = 0,693/\beta \quad (3)$$

$$CL = dosis/AC_{0-\infty} \quad (4)$$

35 en las que  $AC_{0-\infty}$  es el área por debajo de la curva de concentración en función del tiempo, desde cero a infinito. Las diferencias entre los tres preparados se evaluaron mediante una prueba pareada de Student, tomando como propiedades más significativas al inferiores a 0,05.

Ejemplo 8: Determinación de la actividad eritropoyética *in vivo*

Para determinar la actividad eritropoyética *in vivo* de cada preparado, se llevó a cabo un ensayo usando ratones normocitopénicos según la farmacopea europea.

40 Cada muestra que había de analizarse fue diluida usando un tampón de fosfato/albúmina de pH 7,2. El tampón fue preparado según las siguientes instrucciones: disolver 10,75 g de fosfato ácido de sodio y 7,6 g de cloruro sódico en 900 ml de agua destilada; añadir 5 ml de una solución concentrada de 200 mg/ml de albúmina humana y completar con agua destilada csp hasta alcanzar un volumen final de 1.000 ml. Ajustar el pH a 7,2 con una solución de hidróxido sódico diluido o de ácido fosfórico diluido.

Se llevaron a cabo tres disoluciones en serie de orden 3 de la muestra y de un estándar internacional de EPO de una manera en la que las disoluciones del estándar internacional contenían 20, 60 y 180 UI/ml de EPO.

Se inocularon 0,5 ml de cada disolución de la muestra y del estándar en ratones hembra de 2 meses para NMRI mediante inyecciones subcutáneas. Se usaron 6 ratones por disolución.

- 5 Cuatro días después, los ratones fueron anestesiados con pentotal sódico (3 mg/0,5 ml/ratón) y fueron sangrados a través del seno retroorbital usando capilares heparinizados. Se transfirió la sangre a tubos Eppendorf que contenían 5 µl de heparina sódica.

10 Se cuantificaron los reticulocitos tomando 5 µl de un tampón de reticulocitos con pH 7,2. Se preparó el tampón según el siguiente protocolo: disolver 10,75 g de fosfato ácido disódico, 7,6 g de cloruro sódico, 0,2 g de azida de sodio y 0,74 g de EDTA en agua destilada, y luego se lleva hasta un volumen final de 1.000 ml. Ajustar el pH a 7,2.

15 Se agitó con fines de homogeneización y se llevó a cabo una tinción fluorescente añadiendo 0,5 ml de tinción naranja de tiazol en cada tubo. Se mezcló y se dejó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. La lectura se llevó a cabo usando un citómetro de flujo (Becton Dickinson FACSCalibur P/N 34012420). Se leyeron 60.000 eventos para cada muestra y se procesaron los datos usando el programa de recuento de reticulocitos. Se introdujeron los datos en un programa estadístico para obtener potencia de muestreo.

Ejemplo 9: Evaluación de la eritropoyetina de la invención como principio activo para el tratamiento de la septicemia y determinación de una dosis adecuada

Animales: Se usaron ratones Cf1 hembra de 5-7 semanas de edad de aproximadamente 25-30 g de peso.

20 Los animales estaban alojados en el bioterio, en el que fueron mantenidos durante un periodo mínimo de 7 días para permitir su aclimatación, con libre acceso a agua y a una dieta equilibrada. La temperatura del sector se mantuvo a 20° ± 2°C. El régimen de iluminación fue de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad.

25 Los animales recibieron dosis equivalentes a 5 µg/kg, 15 µg/kg, 30 µg/kg y 50 µg/kg, según fuese aplicable a cada caso según el peso expresado en kg, de la eritropoyetina de la invención, EPO comercial (Eprex, Cilag-Jansen), y asialo-EPO mediante inyección subcutánea una hora antes de la inducción de la septicemia en el caso de la prevención, o una hora después sepsis de la inducción de la septicemia en el caso del tratamiento de la septicemia. El grupo de control recibió cantidades similar de solución fisiológica.

30 Se indujo la septicemia usando el modelo de septicemia experimental de doble ligadura y punción del ciego (CLP) (Witcherterman K. A., Baune A. E., Chaudry I. H., Sepsis and septic shock: a review of laboratory models and a proposal, J. Surg. Res. 29: 189-201, 1980, incluido en esta patente solo como referencia). En resumen, los animales ayunaron durante 12 horas antes de la intervención. Para evitar la hipoglucemia, el agua de los bebederos se substituyó por glucosa al 10%. Los ratones fueron anestesiados intraperitonealmente con ketamina/xilacina (133:10 µg/g de ratón) (50 mg/ml de ketamina Holliday® y 20 mg/ml de xilacina Narcocil®). Después, se llevó a cabo una laparotomía media mínima. Se ligó el cielo con sutura quirúrgica a 1 cm de su extremo distal, cuidando de no obstruir la válvula ileocecal. Se practicaron dos orificios en el ciego con una aguja de 18 g distales del sitio de la ligadura. Se comprimió el ciego para hacer pasar una pequeña cantidad del contenido entérico a través de los orificios. El ciego fue introducido en la cavidad peritoneal y se cerró la pared abdominal en dos planos. Por últimos, para garantizar la hidratación de los ratones, se aplicó 1 ml de solución salina al 0,9% mediante inyección subcutánea. A partir de entonces, todos los animales tuvieron libre acceso a agua y comida.

Se realizó una cirugía simulada en un grupo de animales para evaluar el estrés quirúrgico (grupo de simulación).

40 Durante 15 días se evaluó la mortalidad diaria en los ratones que se recuperaron de la anestesia.

En el día 16, se llevó a cabo en ellos un sangrado retroorbital con anestesia para determinar el hematocrito y la hemoglobina, según procedimientos estándar. Por últimos, los animales fueron sacrificados y se realizaron autopsias.

45 Análisis estadísticos: Las curvas quirúrgicas se representaron gráficamente como porcentajes de supervivencia, y los cálculos comparativos entre tales curvas se realizaron usando la prueba de intervalos logarítmicos.

Ejemplo 10: Estudios de daños multiorgánicos

50 Se trataron diferentes grupos de animales con septicemia. Cierta tiempo antes de la CLP, el primer grupo de animales recibió 50 µg of EPO comercial (Eprex, Cilag-Jansen) a través de inyecciones subcutáneas; el segundo grupo, 50 µg del preparado de la invención; y el tercer grupo, 50 µg de solución fisiológica. Los ratones fueron sacrificados de forma aleatoria en los seis primeros días después de la CLP. Se evaluaron los órganos siguientes mediante un estudio histopatológico usando la técnica hematoxilina-eosina: cerebro, corazón, pulmones, intestinos, hígado y riñones. Se estableció el daño relacionado para cada órgano y cada animal según el estudio

histopatológico. El análisis histopatológico fue realizado de forma independiente y a ciegas. Se usó el ensayo exacto de Fisher para comparar la frecuencia de eventos y se consideró significativa una  $p < 0,05$ .

## REIVINDICACIONES

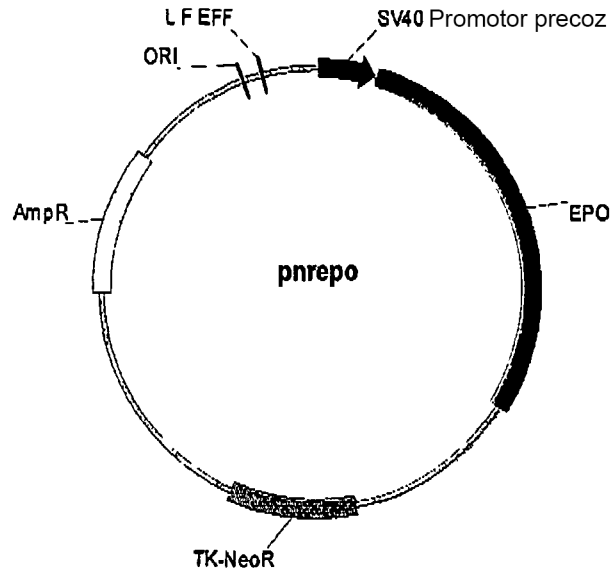
1. Una combinación de glicoisoformas de eritropoyetina que comprende una cantidad entre 2 y 12% de la glicoisoforma 4, que contiene 4 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 5 y 25% de la glicoisoforma 5, que contiene 5 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 9 y 34% de la glicoisoforma 6, que contiene 6 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 9 y 34% de la glicoisoforma 7, que contiene 7 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 10 y 35% de la glicoisoforma 8, que contiene 8 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 2 y 23% de la glicoisoforma 9, que contiene 9 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina y entre 0 y 2% de la glicoisoforma 10, que contiene 10 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, y en la que dicha eritropoyetina es eritropoyetina humana.
2. La combinación según la reivindicación 1 en la que dicha combinación de glicoisoformas de eritropoyetina tiene un perfil de puntos isoeléctricos entre 4 y 5,3 y un perfil de pesos moleculares que oscila entre 32 y 34 kD.
3. Una línea celular transgénica que produce glicoisoformas de eritropoyetina según la reivindicación 1, siendo dicha línea celular la línea celular AB2H52, depositada en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), con número de acceso DSM ACC2727.
4. La línea celular según la reivindicación 3, produciendo y liberando al medio dicha línea celular una combinación de glicoisoformas de eritropoyetina de la reivindicación 1, comprendiendo dicha combinación una cantidad entre 2 y 12% de la glicoisoforma 4, que contiene 4 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 5 y 25% de la glicoisoforma 5, que contiene 5 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 9 y 34% de la glicoisoforma 6, que contiene 6 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 9 y 34% de la glicoisoforma 7, que contiene 7 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 10 y 35% de la glicoisoforma 8, que contiene 8 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 2 y 23% de la glicoisoforma 9, que contiene 9 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina y entre 0 y 2% de la glicoisoforma 10, que contiene 10 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, y en la que dicha eritropoyetina es eritropoyetina humana.
5. La línea celular según la reivindicación 4 en la que dicha combinación de eritropoyetina tiene una actividad adecuada para el tratamiento de la septicemia.
6. La línea celular según la reivindicación 4 en la que dicha combinación de eritropoyetina es un agente seleccionado del grupo constituido por un agente activo adecuado para el tratamiento de la septicemia y un agente activo adecuado para la prevención de la septicemia.
7. La línea celular según la reivindicación 4 en la que dicha combinación de glicoisoformas de eritropoyetina tiene un perfil de puntos isoeléctricos entre 4 y 5,3 y un perfil de pesos moleculares que oscila entre 32 y 34 kD.
8. Una composición farmacéutica adecuada para el tratamiento y la prevención de la septicemia que comprende una combinación de glicoisoformas de eritropoyetina de la reivindicación 1 como agente activo, en la que dicha combinación comprende una cantidad entre 2 y 12% de la glicoisoforma 4, que contiene 4 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 5 y 25% de la glicoisoforma 5, que contiene 5 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 9 y 34% de la glicoisoforma 6, que contiene 6 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 9 y 34% de la glicoisoforma 7, que contiene 7 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 10 y 35% de la glicoisoforma 8, que contiene 8 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 2 y 23% de la glicoisoforma 9, que contiene 9 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina y entre 0 y 2% de la glicoisoforma 10, que contiene 10 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina y excipientes farmacéuticamente aceptables, y en la que dicha eritropoyetina es eritropoyetina humana.
9. La composición según la reivindicación 8 en la que dicha combinación de glicoisoformas de eritropoyetina tiene un perfil de puntos isoeléctricos entre 4 y 5,3 y un perfil de pesos moleculares que oscila entre 32 y 34 kD.
10. La composición según la reivindicación 8 en la que los excipientes se seleccionan del grupo constituido por conservantes, estabilizantes, diluyentes y combinaciones de los mismos.
11. La composición según la reivindicación 8, estando dicha composición en forma de píldoras, cápsulas, masticables, comprimidos, comprimidos efervescentes, soluciones inyectables, partículas y soluciones sublinguales.
12. Un procedimiento para obtener la combinación de la glicoisoforma de eritropoyetina de la reivindicación 1, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:
  - a. Cultivar en un medio de cultivo la línea celular AB2H52, depositada en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) con número de acceso DSM ACC2727, teniendo dicho medio de cultivo



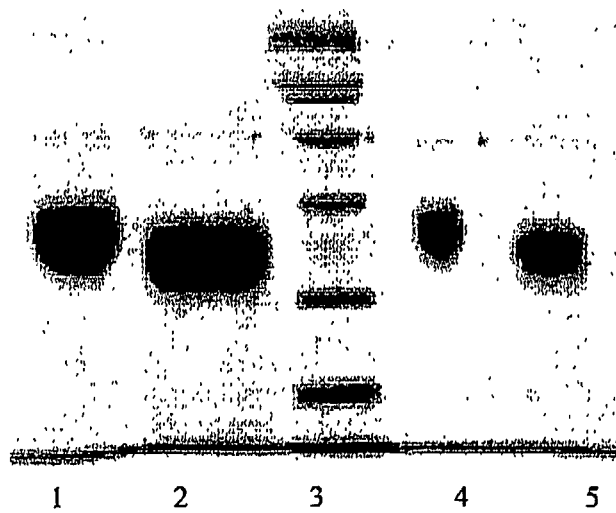
una osmolalidad que oscila entre 310 y 450 miliosmol/kg de disolvente y aditivos seleccionados del grupo constituido por N-acetilglucosamina, cloruro amónico, cloruro sódico y combinaciones de los mismos, y

b. Purificar y aislar la combinación de la glicoisofoma de eritropoyetina producida.

- 5 **13.** El procedimiento según la reivindicación 12 en el que la N-acetilglucosamina presente en el medio de cultivo oscila entre 1 and 100 mM; la cantidad de cloruro amónico presente en el medio de cultivo está entre 1 and 5 mM, y el cloruro sódico está presente en el medio de cultivo en una cantidad entre 10 and 75 mM.
- 14.** El procedimiento según la reivindicación 12 en el que la etapa b) de purificación y aislamiento comprende al menos una etapa cromatográfica.
- 10 **15.** Una combinación de glicoisofomas de eritropoyetina de la reivindicación 1 que comprende una cantidad entre 2 y 12% de la glicoisofoma 4, que contiene 4 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 5 y 25% de la glicoisofoma 5, que contiene 5 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 9 y 34% de la glicoisofoma 6, que contiene 6 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 9 y 34% de la glicoisofoma 7, que contiene 7 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 10 y 35% de la glicoisofoma 8, que contiene 8 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 2 y 23% de la glicoisofoma 9, que contiene 9 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina y entre 0 y 2% de la glicoisofoma 10, que contiene 10 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, en la que dicha eritropoyetina es eritropoyetina humana, para su uso como composición farmacéutica en el tratamiento de la septicemia.
- 15 **16.** La combinación según la reivindicación 15 en la que dicha composición farmacéutica se usa mediante administración parenteral, oral, sublingual o intranasal.
- 17.** La combinación según la reivindicación 15 que comprende también el uso de antibióticos, el aumento del volumen plasmático con cristaloides, el aumento del volumen plasmático con coloides, el soporte de órganos con insuficiencias que incluye el control del choque, el control estricto de la glucemia, la regulación de la inflamación, la regulación de la respuesta procoagulante y combinaciones de los mismos.
- 20 **18.** La combinación según la reivindicación 15 en la que dicha composición farmacéutica se usa en dosis entre 10 y 1000 µg/kg.
- 19.** La combinación según la reivindicación 15 en la que dicha combinación de glicoisofomas de eritropoyetina tiene un perfil de puntos isoeléctricos entre 4 y 5,3 y un perfil de pesos moleculares que oscila entre 32 y 34 kD.
- 25 **20.** Una combinación de glicoisofomas de eritropoyetina de la reivindicación 1 que comprende una cantidad entre 2 y 12% de la glicoisofoma 4, que contiene 4 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 5 y 25% de la glicoisofoma 5, que contiene 5 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 9 y 34% de la glicoisofoma 6, que contiene 6 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 9 y 34% de la glicoisofoma 7, que contiene 7 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 10 y 35% de la glicoisofoma 8, que contiene 8 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, entre 2 y 23% de la glicoisofoma 9, que contiene 9 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina y entre 0 y 2% de la glicoisofoma 10, que contiene 10 moléculas de ácido siálico por molécula de eritropoyetina, en la que dicha eritropoyetina es eritropoyetina humana, para su uso como composición farmacéutica en la prevención de la septicemia.
- 30 **21.** La combinación según la reivindicación 20 en la que dicha composición farmacéutica se usa mediante administración parenteral, oral, sublingual o intranasal.
- 22.** La combinación según la reivindicación 20 que comprende también el uso de antibióticos, el aumento del volumen plasmático con cristaloides, el aumento del volumen plasmático con coloides, el soporte de órganos con insuficiencias que incluye el control del choque, el control estricto de la glucemia, la regulación de la inflamación, la regulación de la respuesta procoagulante y combinaciones de los mismos.
- 35 **23.** La combinación según la reivindicación 20, usándose dicha combinación de glicoisofomas de eritropoyetina en dosis entre 10 y 1000 µg/kg.
- 24.** La combinación según la reivindicación 20, teniendo dicha combinación de glicoisofomas de eritropoyetina un perfil de puntos isoeléctricos entre 4 y 5,3 y un perfil de pesos moleculares que oscila entre 32 y 34 kD.
- 40 **25.** El uso de la combinación de glicoisofomas de eritropoyetina de la reivindicación 1 para fabricar un fármaco para el tratamiento de la septicemia.
- 45 **26.** El uso de la combinación de glicoisofomas de eritropoyetina de la reivindicación 1 para fabricar un fármaco para la prevención de la septicemia.
- 50



**Figura 1**



**Figura 2A**

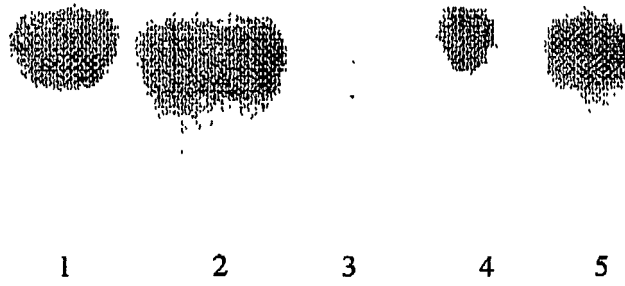


Figura 2B

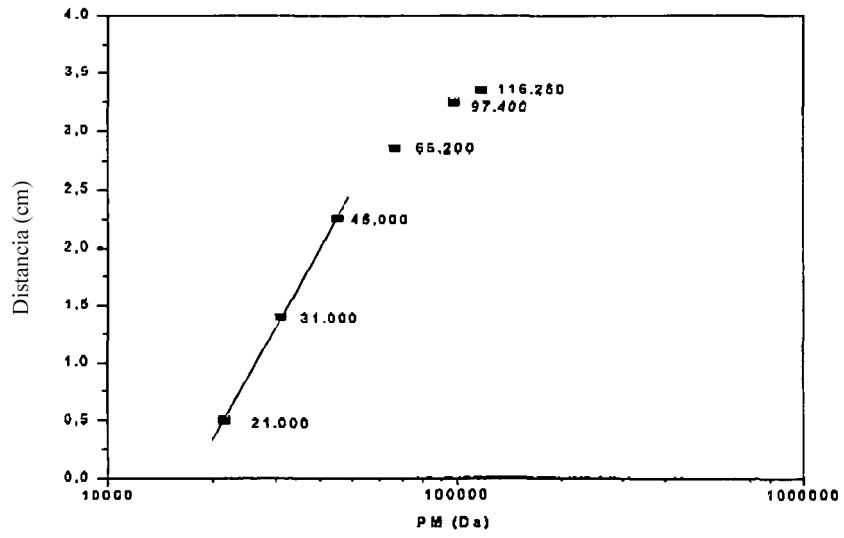


Figura 2C

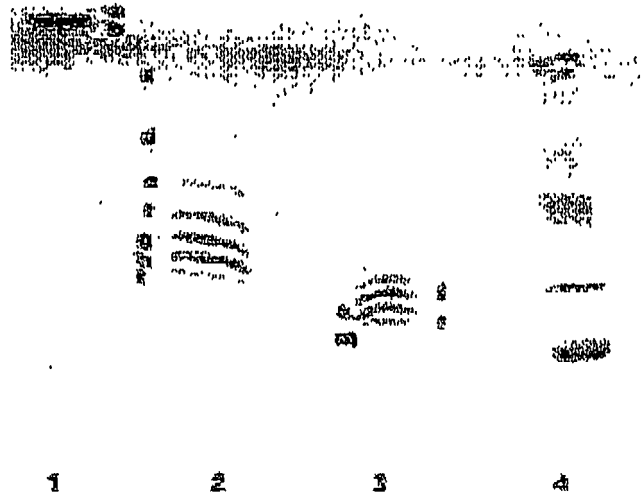


Figura 3A

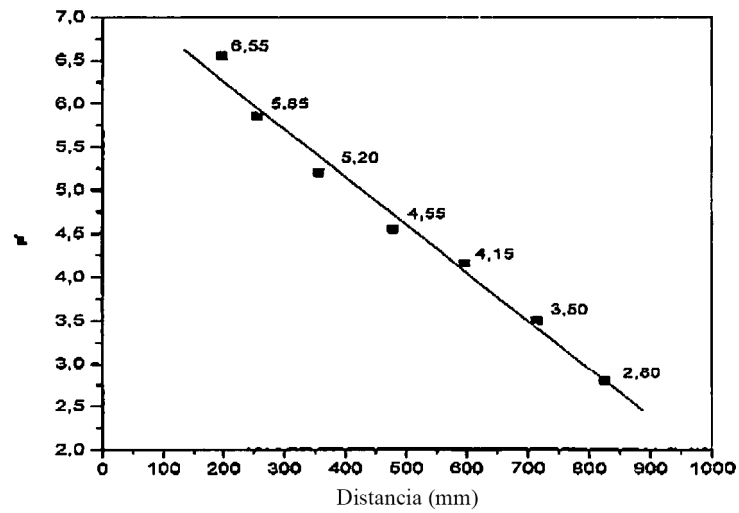


Figura 3B

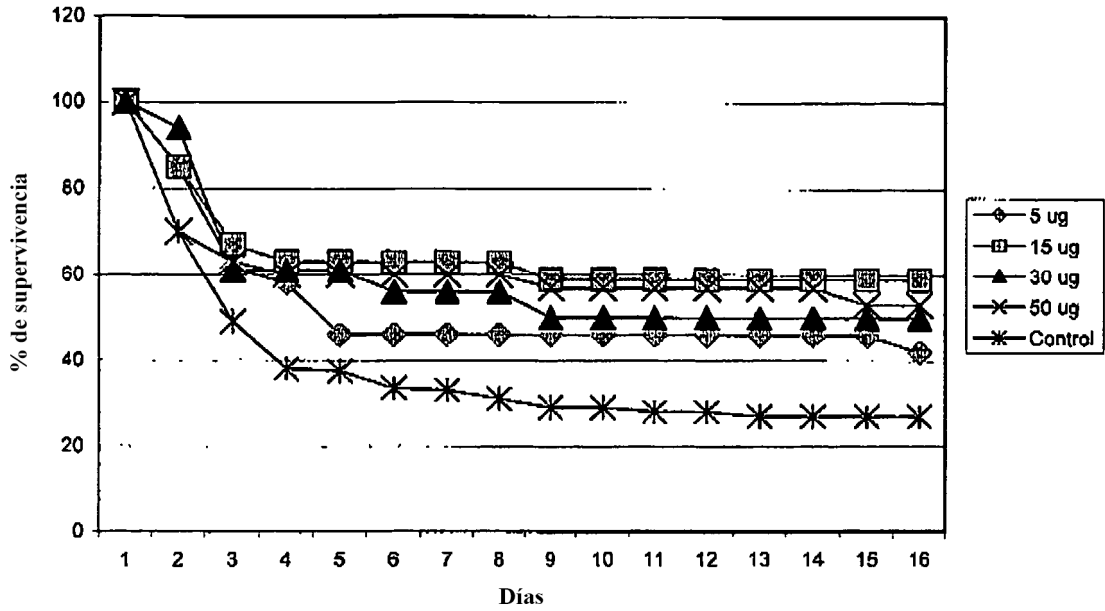


Figura 4

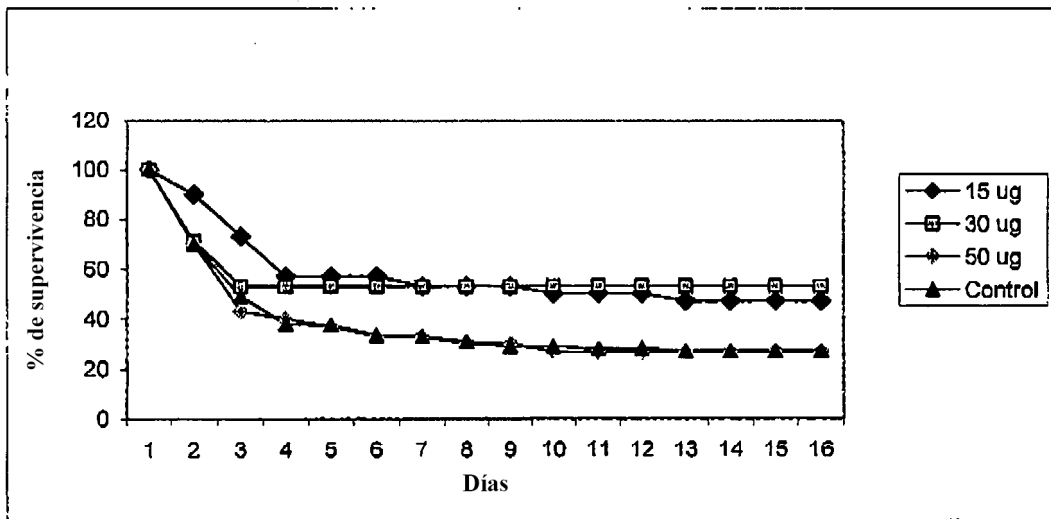


Figura 5

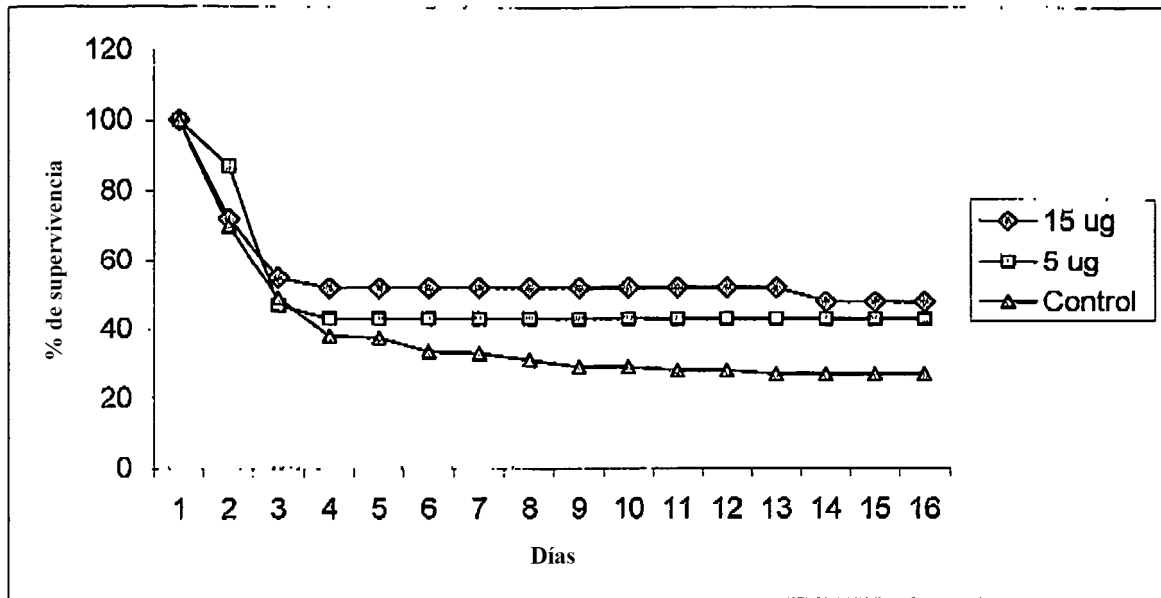


Figura 6

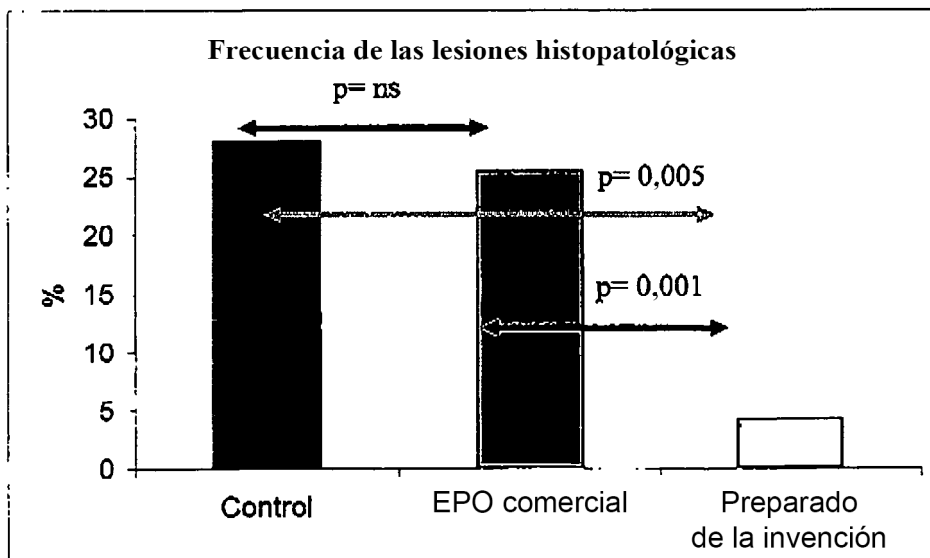


Figura 7

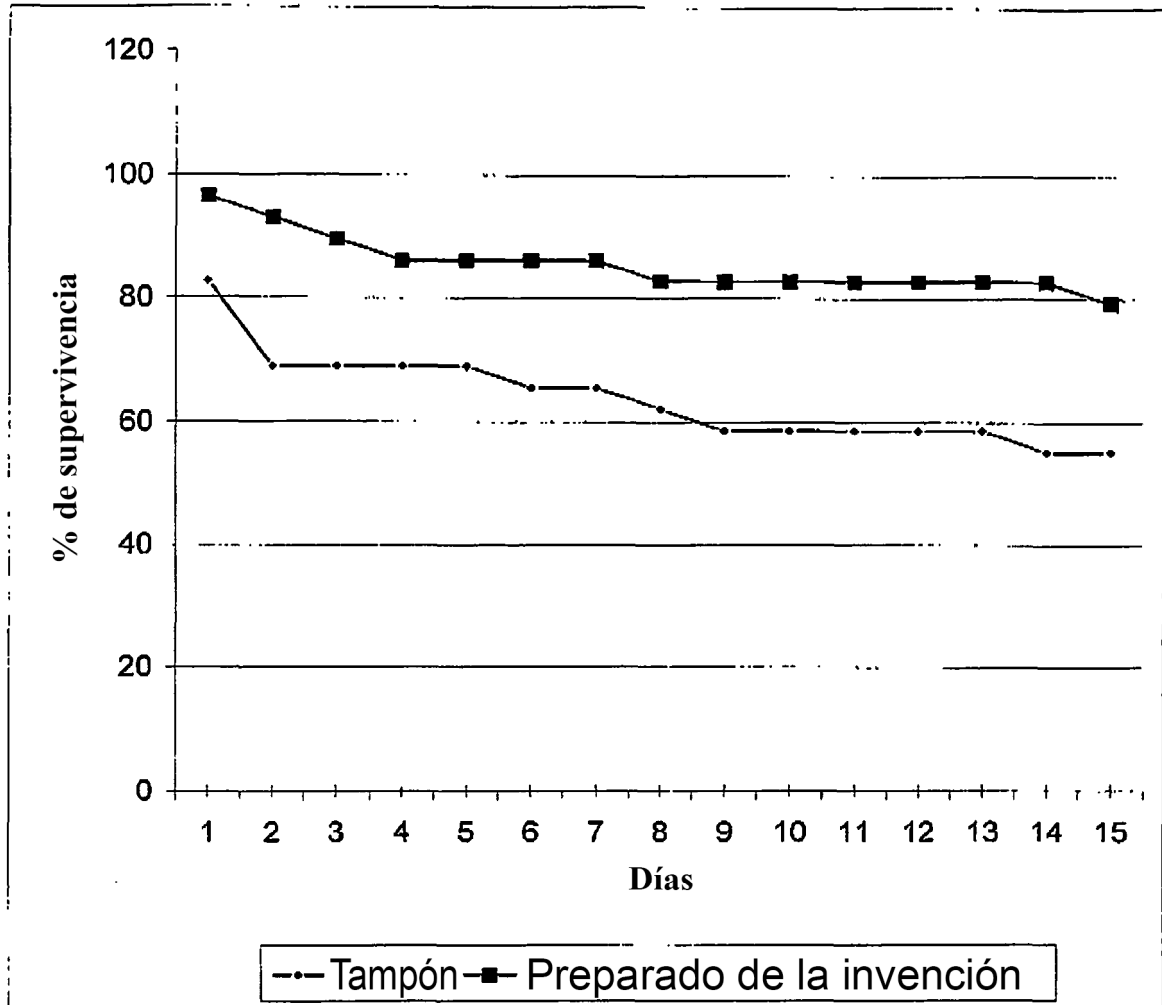


Figura 8